



AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E TOXICIDADE *IN VIVO* DO FITOANTIFÚNGICO MEFENOXAM FRENTE A ISOLADOS DE *PYTHIUM INSIDIOSUM*

ALINE FONTANELLA MACIEL; LARA BACCARIN IANISKI; ANA CAROLINA NOLASCO COLLA; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA; SÔNIA DE AVILA BOTTON

RESUMO

A pitiose é uma enfermidade crônica, geralmente fatal que acomete mamíferos, em diversos países do mundo. A doença é ocasionada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum* que infecta plantas e animais. O diagnóstico e o tratamento da pitiose são desafiadores, uma vez que, os sinais clínicos da enfermidade são semelhantes a algumas doenças fúngicas e parasitárias e na terapia, comumente é associado uma combinação antimicrobianos, imunoterapia e cirurgia. Atualmente, não há um protocolo 100% eficaz, sendo relatado o uso de antibacterianos, antifúngicos e fitoantifúngicos. O mefenoxam pertence aos acilalaninatos e tem ação sobre fitopatógenos como fungos e oomicetos, adicionalmente, há estudo relatando sua atividade *in vivo* na pitiose gastrointestinal canina. Deste modo, este estudo objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ao fungicida agrícola mefenoxam e sua toxicidade *in vivo*. Para tal, utilizou-se 20 isolados de *P. insidiosum* frente a mefenoxam pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M38-A2 do CLSI, a fim de estabelecer as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações oomicidas. A toxicidade do fungicida foi avaliada em modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. A concentração para inibir 100% do crescimento de *P. insidiosum* variou de 0,625 a 10 µg/mL, e sua concentração oomicida variou de 1,250 a 20 µg/mL. Não houve evidências de toxicidade no modelo experimental *in vivo* utilizado. Portanto, o fitoantifúngico não apresentou toxicidade nas doses avaliadas e possui atividade inibitória frente ao oomiceto patogênico *P. insidiosum*. Contudo, maiores avaliações sobre a farmacocinética e toxicidade do mesmo em diferentes espécies animais e possíveis interações farmacológicas são necessárias para inferir um possível uso no manejo clínico da pitiose.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*; Fungicidas agrícolas; Oomiceto; Pitiose.

1 INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático que coloniza plantas para reproduzir-se dando origem aos zoósporos biflagelados (forma infectante) que se movimentam até encontrar uma nova planta ou parasitar diversas espécies animais, principalmente mamíferos, incluindo seres humanos (MILLER, 1983, SANTURIO, et al., 2006). Agente etiológico da pitiose, *P. insidiosum* possui distribuição mundial, com maior ocorrência em humanos na Índia e Tailândia e em equinos no Brasil (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2022).

Esta enfermidade apresenta limitações no diagnóstico, sendo necessário o emprego de técnicas com melhor sensibilidade e especificidade. Métodos laboratoriais, em sua maioria,

exigem estrutura complexa e pessoal especializado (GAASTRA et al., 2010). Adicionalmente, não existe um tratamento padrão para a pitiose, estando os protocolos disponíveis baseados em cirurgia, imunoterapia e uso de compostos com atividade antimicrobiana (ARGENTA et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009; GAASTRA et al., 2010; LORETO et al., 2011; JESUS et al., 2015; ITAQUI et al., 2016; VALENTE et al., 2016; LORETO et al., 2018; IANISKI et al., 2020).

O antifúngico mefenoxam normalmente é empregado em tratamentos agrícolas (YOLANDA; KRAJAEJUN, 2020). Este fungicida pertence aos acilalaninatos e tem ação sobre fitopatógenos como fungos e oomicetos. Brown et al. (2008) relataram sua atividade *in vitro* frente a *P. insidiosum* e, posteriormente, foi empregado em terapias associadas no tratamento de pitiose canina (HUMMEL et al., 2011; CRIDGE et al., 2020).

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ao fitoantifúngico mefenoxam e verificar sua toxicidade *in vivo*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos testes de suscetibilidade *in vitro*, utilizou-se um total de 20 isolados de *P. insidiosum*, sendo 17 isolados clínicos brasileiros (16 de origem equina e 1 de origem canina) e três cepas padrão (CBS 119455, CBS 57585 e CBS 77784), todos os isolados estão identificados molecularmente, de acordo com Weiblen et al. (2019). O mefenoxam (Metalaxyl®, pureza 99,5%, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) foi obtido comercialmente. O estudo empregou o método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institutes* (CLSI). O inóculo foi obtido a partir da indução *in vitro* da zoosporogênese, descrito por Pereira et al. (2007) com modificações de Ianiski et al. (2020), apresentando 2 a 3×10^3 zoósporos/mL, diluídos em caldo RPMI 1640, pH 7.0. Resumidamente, o processo experimental consiste em utilizar isolados de *P. insidiosum* cultivados previamente em *Corn Meal Agar* (CMA) e posteriormente transferi-los para placas contendo ágar V8 e incubar a temperatura de 37°C no período de 48h.

Posteriormente, acrescentou-se fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente esterilizados e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 48h. Após o período, os fragmentos de grama foram transferidos para nova placa de Petri contendo meio de indução e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, as placas foram agitadas a 3000 rpm/5min e realizou-se a contagem de zoósporos livres em câmara de Neubauer com auxílio do microscópio ótico. Utilizando placas de 96 poços, adicionou-se o inóculo e concentrações crescentes do fármaco (0,019 a 10 µg/mL) e, após 24h de incubação a 37°C, realizou-se a leitura das placas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada isolado, através da observação visual da presença ou ausência de crescimento micelial, comparado ao controle positivo e negativo. Na leitura dos resultados, foram determinadas as CIM0 (100% de inibição do crescimento), CIM1 (inibição do crescimento $\geq 90\%$) e CIM2 (inibição do crescimento $\geq 50\%$) de mefenoxam para todos os isolados, bem como sua respectiva concentração oomicida mínima (COM). Os testes foram realizados em triplicatas.

Para a avaliação da toxicidade *in vivo* do fármaco seguiu-se protocolo descrito por Wu et al. (2013), com modificações (FRIZZO et al. 2018). Utilizou-se o modelo *Caenorhabditis elegans* em seu estágio de L1 devido a sua maior sensibilidade às substâncias tóxicas (CHU et al. 2005, XING et al. 2009). As larvas foram obtidas do Centro de Genética *Caenorhabditis* (Universidade de Minnesota, EUA) e foram isoladas de embriões de hermafroditas grávidas usando uma solução de branqueamento (1% NaOCl, 0,25 M NaOH), e posteriormente foram mantidas em tampão M9 (42mM Na₂ HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8,6 mM NaCl e 1 mM MgSO₄) durante a noite para eclodir para obter o estágio L1 (BRENNER, 1974). Em média, 500 *C. elegans* foram transferidas para microtubos contendo diferentes concentrações de

fármaco (5, 20 e 50 µg/mL) em tampão M9, e DMSO a 0,004% foi usado como controle. Após 1h, as larvas foram lavadas três vezes com tampão M9 para remoção do tratamento e deixadas em recuperação por 1h em tampão M9. Para avaliação, aproximadamente 100 larvas por grupo foram classificadas como mortas ou vivas usando um estereomicroscópio, desse modo as larvas que reagiram a um estímulo mecânico com fio de platina foram classificadas como vivas e as que não responderam foram consideradas mortas.

Na avaliação da toxicidade, as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A estatística entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunnett. Os valores são representados como médias \pm erro padrão da média (SEM), os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nos testes de suscetibilidade *in vitro* demonstram que mefenoxam inibiu 100% o crescimento micelial de *P. insidiosum* em concentrações de 0,625 a 10 µg/mL (tabela 1), bem como não apresenta efeitos de toxicidade nas concentrações testadas no modelo *in vivo* *C. elegans* (figura 1).

Anteriormente, estudos realizados por Brown et al. (2008) empregando o método de disco difusão para avaliar a suscetibilidade *in vitro* de seis isolados de *P. insidiosum* frente a mefenoxam, demonstraram que a concentração de 1 µg/mL foi responsável pela inibição de >90% para todos os isolados. Entretanto, no nosso estudo observou-se uma maior variação dos valores de CIM obtidos para o respectivo fármaco, o que pode ser resultado da utilização de diferentes técnicas de avaliação e também devido utilizarmos um maior número de isolados de *P. insidiosum*. Todavia, estudos *in vivo* relatam a ação de mefenoxam em associação a outras drogas e técnicas cirúrgicas no tratamento da pitiose canina; porém, estudos adicionais são necessários para inferir o sinergismo do resultado terapêutico (HUMMEL et al., 2011; CRIDGE et al., 2020).

Em relação a toxicidade *in vivo* de mefenoxam, esta foi previamente estabelecida na literatura, para a liberação comercial (FAO & WHO, 2019). Porém, é necessário realizar avaliações da toxicidade em diferentes modelos experimentais para possibilitar futuros ensaios terapêuticos e em diferentes espécies animais e, deste modo, incluir na terapia da pitiose.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Pythium insidiosum* (n=20) frente a mefenoxam.

Concentrações inibitórias e oomicidas (µg/mL)	Mefenoxam
CIM0 (MG)	0,625 - 10,000 (2,76)
CIM1 (MG)	0,312 - 5,000 (1,38)
CIM2 (MG)	0,156 - 2,500 (0,69)
COM (MG)	1,250 - 20,000 (6,30)

CIM0: 100% de inibição do crescimento; CIM1: inibição do crescimento $\geq 90\%$; CIM2: inibição do crescimento $\geq 50\%$; COM: concentração oomicida mínima; MG: média geométrica.

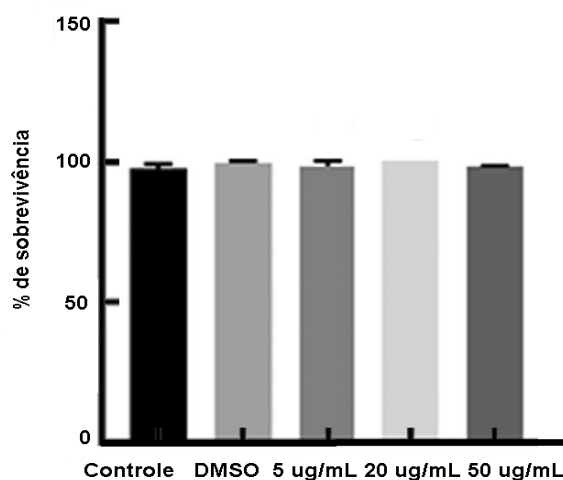


Figura 1: Toxicidade de mefenoxam em modelo experimental *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. Curva de sobrevivência de *C. elegans* no estágio L1 após 1 h tratamento com mefenoxam, $p > 0,05$.

4 CONCLUSÃO

O mefenoxam apresenta atividade inibitória *in vitro* contra *P. insidiosum*, bem como não produz mortalidade do modelo *in vivo* nas concentrações testadas. Contudo, mais estudos são necessários como avaliação da citotoxicidade e farmacocinética em outros modelos de experimentação abrangendo outras espécies a fim de verificar a possível inclusão deste fungicida no arsenal terapêutico da pitiose.

REFERÊNCIAS

- ARGENTA, J. S. *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 2, 767-769, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FAAC.01075-07>.
- BRENNER, S. *et al.* The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v.77, n.1, p.71-94, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1093%2Fgenetics%2F77.1.71>.
- BROWN, T. A. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 1463-1468, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.11.1463>.
- CAVALHEIRO, A. S. *et al.* *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.036>.
- CHU, K.W. *et al.* Improvement of heavy metal stress and toxicity assays by coupling a transgenic reporter in a mutant nematode strain. **Aquatic Toxicology**, v.74, n.4, p. 320-332, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.006>.

CRIDGE, H. *et al.* Mefenoxam, itraconazole, and terbinafine combination therapy for management of pythiosis in dogs (Six Cases). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 56, n. 6, p. 307, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7039>

FAO & WHO. 2019. Pesticide residues in food 2018 -Report 2018 - Joint FAO/WHO meeting on pesticideresidues. InFAO Plant Production and Protection Paper no. 234. p.268.

FRIZZO, C.P. *et al.* Impact of Anions on the Partition Constant, Self-Diffusion, Thermal Stability, and Toxicity of Dicationic Ionic Liquids. **ACS Omega**, v.3, n.1, p. 734-743, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01873>.

GAASTRA, Wim *et al.* *Pythium insidiosum*: an overview. *Veterinary Microbiology*, v. 146, p. 1-16, 2010. ISSN 0378-1135. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.019>.

HUMMEL, J. *et al.* Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine, and mefenoxam. **Medical mycology**, v.49, n.5, p. 539-542, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.543705>.

ITAQUI, S. R. *et al.* *In vitro* synergism between azithromycin or terbinafine and topical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5023-5025, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00154-16>.

IANISKI, L. B. *et al.* *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 67-73, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa03>.

JESUS, F. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, p. 87-91, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FAAC.01480-15>.

LORETO, E. S. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p. 3588- 3590, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FAAC.01586-10>.

LORETO, É. S. *et al.* *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, e01678-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01678-17>.

MILLER, R. I. Investigation into the biology of three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, p. 23-28, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00443905>

PEREIRA, D. I. B. *et al.* Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1168-1171, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm332>.

SANTURIO, J. M. *et al.* Pythiosis: an emerging mycosis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-14, 2006. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.15060>.

VALENTE, J. S. S. *et al.* *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, p. 998–1003, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13234>.

WEIBLEN, C. *et al.* Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. **Ciência Rural**, v. 49, n. 01, e20180744, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180744>.

WU, Q. *et al.* Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v.90, n.3, p.1123-1131, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.019>.

XING, X. *et al.* Lethality Toxicities Induced by Metal Exposure During Development in Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.83, p. 530-536, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9816-3>.

YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Review of methods and antimicrobial agents for susceptibility testing against *Pythium insidiosum*. **Heliyon**, v.6, n. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03737>.

YOLANDA, H; KRAJAEJUN, T. Global Distribution and clinical features of pythiosis in humans and animals. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 182, p. 1-18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fjof8020182>